B205

AFM プローブ極先端に蛋白質分子を拾う

○荒川 秀雄、山田 隆文、猪飼 篤（東工大・生命理工）

蛋白質のような複雑な分子は個々の分子のとりうる状態が多数あるため、多数の分子の平均値を得るだけではそれらの状態間にどのように分布しているのかを知ることは容易ではない。従って個々の分子から情報を得ることが重要になるが、そのようなことができる手法も、得られる情報もまだまだ限られているのが現状である。そうした中で、原子間力顕微鏡（Atomic Force Microscope, AFM）を使って分子の力学的特性を調べる方法は、近年大きな発展を見せている。一方、蛍光顕微鏡、特に全反射型蛍光顕微鏡（Total Internal Reflection Fluorescence Microscope, TIRFM）もまた1分子の情報を検出できる方法として多くの成果を上げている。我々は、この2つの方法を組み合わせることで、蛋白質の力学的な特性・構造とその機能の関係を調べられるかを探索している。そして、最初の試みとして、蛍光性の蛋白質である GFP をその対象として選んだ。

まずはじめに必要なのは、プローブ先端の力の加わる部分にだけ蛋白質を付ける工夫であった。そこでガラス基板上に非特異的吸着で GFP を結合させておき、その N 末端に導入された Cys 残基の側鎖と金コートされた AFM プローブの表面との Au-S 結合を利用して、これを拾い上げた。拾い上げるときのフォースカーブから、釣り上げる頻度が丁度良いように接触時間・接触圧を調整することができる。釣り上げた GFP 分子は、TIRFM 上でプローブ先端をガラス表面からエバネッセント場の厚み程度の距離まで近づけたときに、蛍光を発することで確認できた。

この手法によって AFM プローブの先端のみを特異的に修飾することで開かれる、AFM と TIRFM を組み合わせた広範な応用について、修飾時に試料に延伸力がかかってしまう問題点と共に考察する。

H.Arakawa, T.Yamada and A.Ikai : Picking up protein molecules at the very tip of AFM probe

B207

真空紫外円二色性分散計によるタンパク質の二次構造解析

○米原 隆太¹、松尾 光一¹、月向 邦彦^{1,2}（¹ 広大院・理、² 広大・放射光）

円二色性 (CD) スペクトルの測定波長を 190nm 以下の真空紫外 (VUV) 領域へ拡張することができれば、生体物質の構造解析においてより詳細かつ新規な情報が得られるものと期待される。そこで我々は、広島大学放射光科学研究センター (HiSOR/HSRC) のビームライン 15 を放射光源とし、高真空中において水溶液中で 140nm までの VUV 領域で CD スペクトル測定が可能な真空紫外円二色性 (VU-VCD) 分散計の開発を行ってきた。本研究では、構造が既知な 13 種類のタンパク質の VU-VCD スペクトルを水溶液中で 160nm まで測定し、波長領域の拡張による二次構造含有量の予測精度の向上について検討した。種々の二次構造含有量をもつ 13 種類の基底タンパク質 (myoglobin, hemoglobin, HSA, α -lactalbumin, cytochrome C, β -lactoglobulin, ovalbumin, lysozyme, ribonuclease A, chymotrypsinogen, pepsin, trypsinogen, STI) の VU-VCD スペクトルを数%水溶液、25℃で測定した。その結果、VUV 領域において、 α -helix の多いタンパク質では 170nm 付近に負のピークが、 β -sheet の多いタンパク質では 175nm 付近で負の、165nm 付近で正のピークが新たに観測された。タンパク質の二次構造解析は、既存の特異値分解法を用いた SELCON プログラムの適用波長を 160nm まで拡張することにより行った。それぞれの二次構造含有量は PDB データから DSSP 法により算出した。この二次構造解析法をテストするために、基底タンパク質の中から 1 つのタンパク質を構造未知のタンパク質として選び、その二次構造含有量 (α -helix, β -sheet, β -turn, unordered) を予測した。X 線結晶構造と比較した結果、170nm までの波長領域拡張により、最良の予測精度が観測された。これらの結果は、CD スペクトルの真空紫外領域への拡張が、タンパク質の二次構造解析に有効であることを示している。

R. Yonehara, K. Matsuo, and K. Gekko : Analysis of Protein Secondary Structure by Vacuum-Ultraviolet Circular Dichroism Spectroscopy

B206

アンジュレータ放射光の偏光変調を用いた真空紫外円二色性スペクトルの測定

○山田 亨¹、渡辺 一寿²、田中 真人³、金子 房恵⁴、北田 朋⁴、中川 和道⁵（¹ 産総研・脳神経、² 産総研・光技術、³ 神戸大・自然科学、⁴ 神戸大・総合人間科学、⁵ 神戸大・発達科学）

【はじめに】タンパク質、核酸、糖鎖などの生体高分子はキラリティを反映した円二色性を示すことが知られており、近年では放射光と透過型偏光変調素子を用いて真空紫外領域での円二色性測定が試みられている。しかし透過型素子は透過波長に限界をもつため、我々は独自に産総研の電子蓄積リング TERAS のアンジュレータを偏光変調光源として利用することで、従来の波長限界を超える短波長領域で円二色性測定を可能にする測定法を考案し、ビームラインの整備を進めてきた。今回いくつかの標準試料を用いた測定に成功したので、この結果を含めて測定法の概要を報告する。

【測定法】用いたアンジュレータからは紫外から 30nm に及ぶ波長領域で半値幅約 25%の強度スペクトルを持つ放射光を得られる。約 2.0Hz で左右円偏光を、またその倍の周波数で垂直水平直線偏光を放射する偏光変調運転が現在可能である。この変調光を直入射前置鏡、真空分光器 (Acton, VM502)、入射光モニター部を経て、試料に透過させ、サリチル酸により波長変換したのち、石英窓外の光電子増倍管で光強度を測定した。偏光変調に伴うわずかな変動成分から円二色性を検出するため、光強度の直流成分の定電圧サーボを行い、入射光強度と透過光強度の差を変調の基本周波数でロックイン検出した。この直流成分に対するロックイン検出信号の比から円二色性を算出した。

【結果】d-体およびl-体の 10-camphorsulfonic acid を石英基板に蒸着した試料を測定した結果、290nm および 180nm 付近におけるピークがd-体およびl-体の試料で符号対称に得られ、キラリティによる円二色性の信号検出が示された。また得られたスペクトル形状と強度は既存の測定装置 (Jasco, J-720) による結果とよく一致することが示された。

T.Yamada, K.Yagi-Watanabe, M.Tanaka, F.Kaneko, T.Kitada, and K.Nakagawa : Measurement of VUV circular dichroism spectra by using polarization modulation of undulator radiation

B208

酵素反応におけるマイクロウェーブの利用

○大内 将吉^{1,2}、梅野 学²、大塚 康彦²、金光 和保¹（¹ 九工大・情報工、² 九工大・生命体工）

近年頻繁に、マイクロウェーブを用いた有機反応が報告されており、非常に短時間で、また効率良く目的物が得られているとともに、反応溶媒を必要としないなどの、多くの実験結果が従来の有機合成化学の概念を覆すものとなっている。これらの実験結果から、徐々にそのメカニズムが明らかになってきているが、マイクロウェーブの効果は、双極子モーメントと分子サイズ・分子量によって支配されていると考えられる。すなわち、双極子を持たない分子、あるいはプラスチックなどの高分子は、マイクロウェーブ照射の影響を受けない。つまり、酵素反応においては、高分子量である酵素は影響を受けないのではないかと考え、ホスホトリエステラーゼ (PTE) を触媒として用いた際にマイクロウェーブを照射し、エステル交換反応の進行を検討した。凍結乾燥後の酵素にマイクロウェーブを照射し、その後活性測定をしたところ、活性が残っていたことから、酵素自身にはまったく影響はなかったと判断し、無溶媒での反応を検討した。立体選択性は不十分であったものの、短時間、高収率で目的物が得られた。加えて、この反応系において、酵素を繰り返し使用することも検討し、良好な結果を得た。酵素を無溶媒条件下で使用しマイクロウェーブの効果でこのような結果を得たのは過去に例がない。

Shokichi Ohuchi, Manabu Umeno, Yasuhiko Ohtsuka, and Kazuyasu Konko : The use of microwave on the enzymatic reaction.